

### EBY100 Chemically-Library Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: YCL1110)

EBY100 Chemically-Library Competent Cell	600μl /支	保存: -80°C (3个月)
pGBKT7 (control vector, 10ng/μl)	10μl	保存: -80°C (12个月)
Carrier DNA (10μg/μl)	300μl	保存: -20°C (12个月)
PEG/LiAc	15ml	保存: 4°C (12个月)

#### ● 基因型

MATa AGA1::GAL1-AGA1::URA3 *ura3-52 trp1 leu2-delta200 his3-delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL*

#### ● 产品说明

EBY100 菌株是 Invitrogen 公司开发的酵母展示用菌株, MATa 型, 与 pYD1 质粒配套使用, 可直接转化质粒进行蛋白展示试验; Transformation marker 为: *leu2, trp1*。EBY100-pYD1 酵母展示系统通过酿酒酵母的 a 凝集素受体 (a-agglutinin receptor) 将目标蛋白展示在细胞表面, 方便后期筛选。其基本原理为: a 凝集素受体由 AGA1 和 AGA2 两个亚基组成, AGA1 蛋白(725 个氨基酸)由 EBY100 细胞合成, 分泌到细胞外, 在细胞外基质中与酵母细胞壁的 β-葡聚糖共价结合, AGA2 蛋白(69 个氨基酸)可以通过两个二硫键结合到 AGA1 蛋白上; 将目标蛋白构建到 pYD1 质粒上, 与 AGA2 蛋白融合表达, AGA2 蛋白在 N 端, 目标蛋白在 C 端, 当含有 pYD1 质粒的 EBY100 酵母菌在含有半乳糖, 同时不含葡萄糖的培养基中诱导表达时可以表达出 AGA2-target protein 融合蛋白, 该融合蛋白通过 AGA2 结合到 EBY100 酵母细胞表面的 AGA1 蛋白上进而将目标蛋白展示在酵母表面。EBY100 Chemically-Library Competent Cell 为构建酵母文库用化转感受态, 经特殊工艺制作, -80°C 可保存三个月, pGBKT7 质粒 (7303bp, Kan<sup>R</sup>) 检测转化效率 >10<sup>6</sup> cfu/μg DNA。

#### ● 操作方法

1. Carrier DNA 的预处理: 将 Carrier DNA 插入 95°C 金属浴 5 min 或插入浮漂中 95°C 水浴 3 min, 加热后快速插入冰中。
2. 取 600 μl 冰上融化的 EBY100 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 2-15 μg (加入 DNA 的体积不超过 50ul, DNA 纯度越高越好), 预处理的 Carrier DNA 60 μl, PEG/LiAc 1ml, 吸打几次混匀, 转移到事先准备好的 10ml 圆底离心管中, 补加 PEG/LiAc 2ml, 混匀, 30°C 水浴 60 min (30 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 将管放 42°C 水浴 20 min (10 min 时翻转 6-8 次混匀)。
4. 5000 rpm 离心 2 min 弃上清, ddH<sub>2</sub>O 10ml 重悬, 离心 2min 弃上清, ddH<sub>2</sub>O 1-10ml 重悬, 涂板, 29°C 培养 48-96 h。
5. 为提高转化效率也可 5000 rpm 离心 2 min 弃上清后加入 3ml YPD Plus 重悬, 30°C, 200rpm 摇菌 1.5h。离心 2min 弃上清, 加入 1-10ml 0.9% 的氯化钠重悬涂板。

### ● 培养基配制

#### ① YPD (1L)(唯地 CAT#: YM1010):

Peptone 20g  
Yeast extract 10g  
补水到 950ml, 用盐酸调 PH 到 6.5;  
Agar 20g(for plates only)  
121°C, 15 min 高压灭菌;  
待培养基温度降到 55°C时, 加入已过滤的 40% 葡萄糖 50 ml。

#### ② SD medium (1L)(唯地 CAT#: YM3101-YM3611):

Yeast Nitrogen base 6.7g  
葡萄糖 20g  
Dropout 适量 (按说明书)  
补水到 1L, 调 PH 至 5.8;  
Agar 20g(for plates only)  
121°C, 15 min 高压灭菌。

#### ③ YNB-CAA Medium (1L)(唯地 CAT#: YEM7001):

0.67% YNB (with ammonium sulfate, without amino acids)  
0.5% Casamino acids (-ade, -ura, -trp)  
2% glucose or galactose

### ● 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰上融化, 加入质粒 DNA 的体积不超过 50ul, 文库质粒纯度越高越好。
2. 文库用酵母感受态的转化效率数据是在加入不超过 100ng 标准质粒的试验中获得, 若加入质粒过多, 虽然得到的菌落数会增加, 但是由此计算的转化效率会下降。
3. 在进行 EBY100 的诱导表达时, 要去除培养基中的葡萄糖, 加入 2% 的半乳糖或同时加入 2% 的半乳糖和棉子糖。
4. 转化 pYD1 质粒到 EBY100 菌株后的筛选平板可以用 SD/-Trp/-Ura, 也可以用 Minimal Dextrose Plates (with Amino Acids); 诱导目的蛋白表达, 可以用 SG/-Trp/-Ura, YNB-CAA Medium(with galactose), 也可以使用 SGR-CAA Medium (同时添加了半乳糖和棉子糖, 目标蛋白的诱导效果更好)。
5. 棉子糖在 EBY100 菌株诱导表达时的作用: 葡萄糖是最好的酵母碳源, 利用率高, 生长速度快, 在葡萄糖存在时酵母优先利用葡萄糖, 但是葡萄糖与半乳糖拮抗, 所以在加入半乳糖诱导目的蛋白表达时要去除培养基中的葡萄糖; 虽然有一些文献报道半乳糖可以同时作为半乳糖启动子的诱导剂和碳源使用, 但在实际使用过程中酵母对半乳糖的同化能力很弱, 若培养基中只含有半乳糖, 酵母几乎不能生长, 或生长很慢, 目标蛋白的表达量会下降; 在 EBY100 诱导表达培养基中添加 1-2% 的棉子糖可以促进酵母生长, 提高目标蛋白的表达量。
6. EBY100 酵母菌株对高温敏感, 最适生长温度为 27-30°C; 高于 31°C, 生长速度和转化效率呈指数下降。
7. 酵母在缺陷培养基中生长速度比 YPDA 培养基慢, 培养基中缺陷成分越多, 生长越慢。以转化涂板为例: 涂 YPDA 平板 29°C 48 h 培养可见直径 1 mm 克隆; 涂 SD 单缺平板 29°C 48-60 h 培养可见直径 1 mm 克隆, 涂 SD 双缺平板 29°C 60-80 h 培养可见直径 1 mm 克隆, 涂 SD 三缺/四缺平板 29°C 80-90h 培养可见直径 1 mm 克隆。